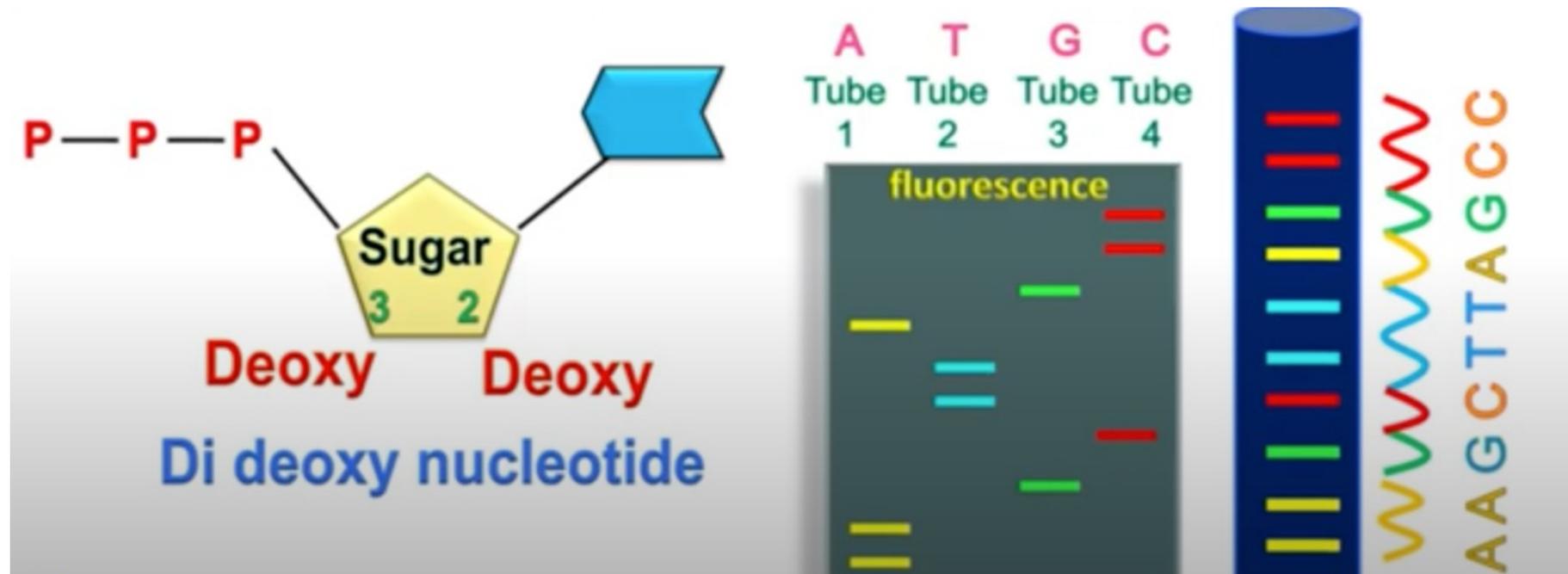


## Méthode de Fred. Sanger



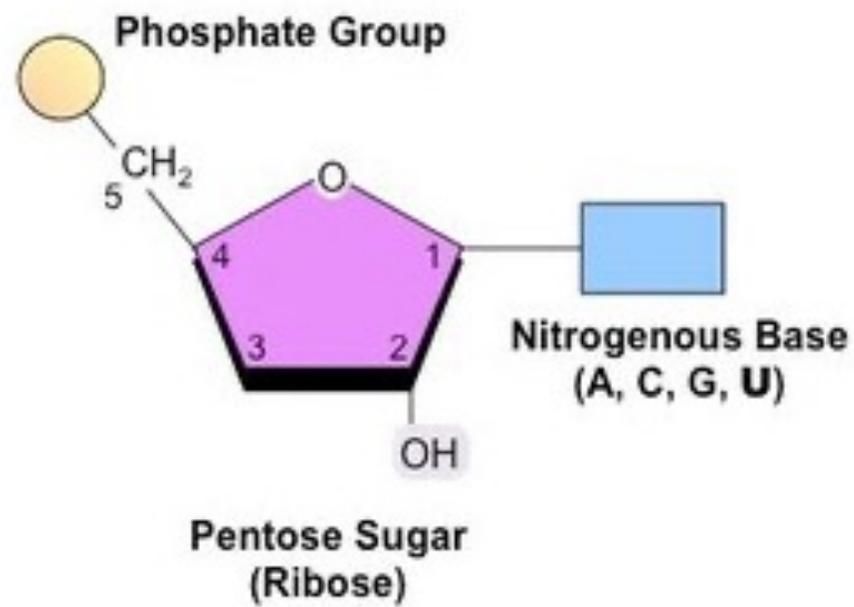
# Introduction

## Historique

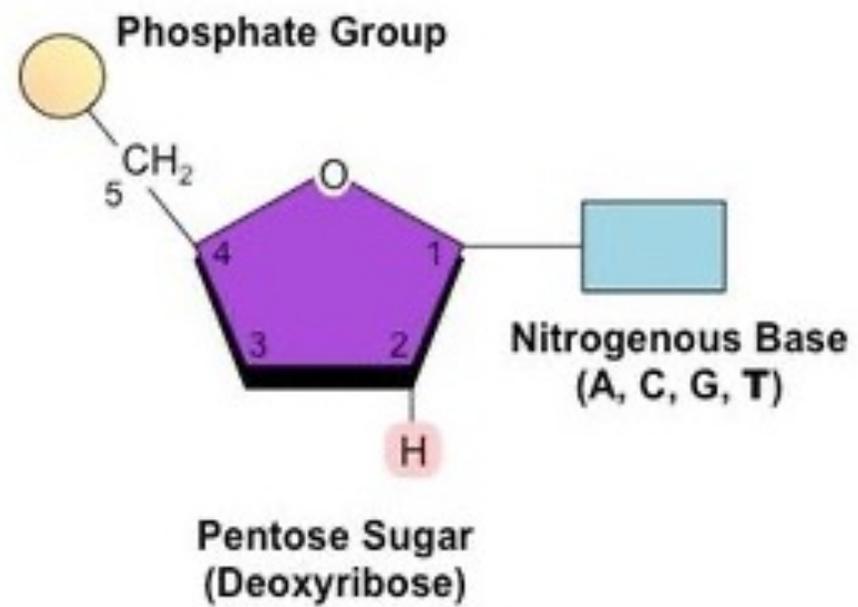
Le premier organisme a été séquencé en 1977.

virus bactériophage X174, possédant un ADN simple brin ne nécessitant donc pas l'étape de dénaturation utilisé dans les méthodes de Sanger et Maxam et Gilbert.

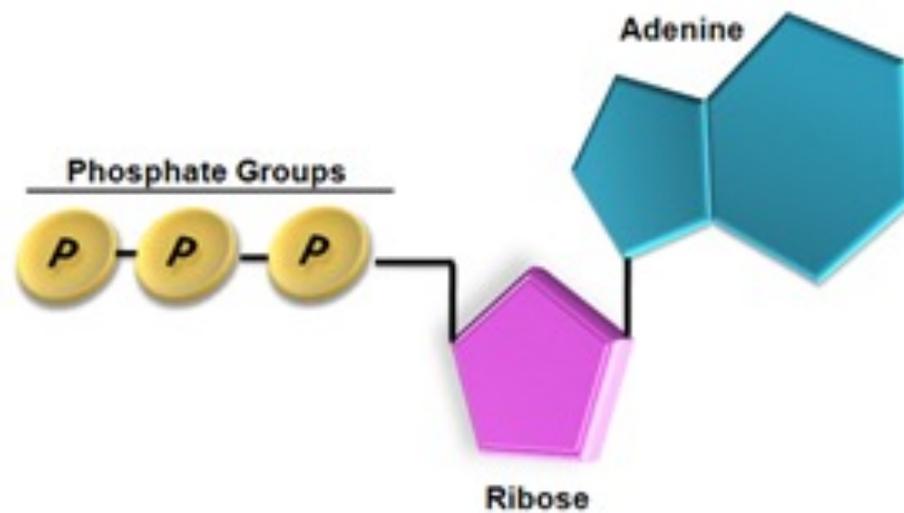
Depuis une trentaine d'année, l'amélioration de la technique de production des amorces, de l'amplification des brins et la généralisation des traceurs fluorescents ont permis d'améliorer considérablement les techniques de séquençage.



**RNA Nucleotide**

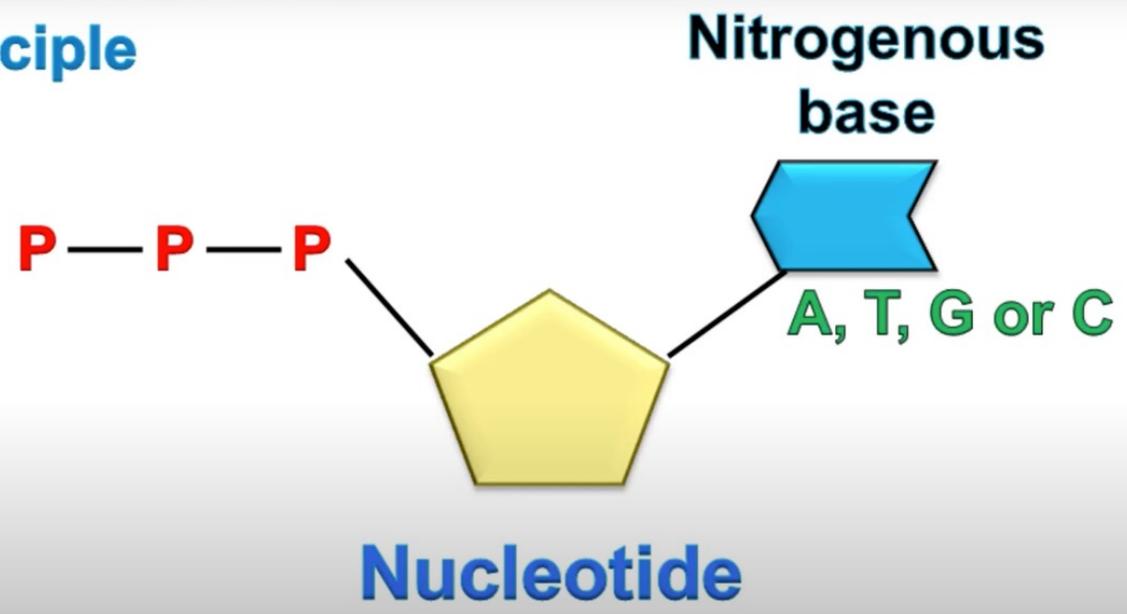


**DNA Nucleotide**



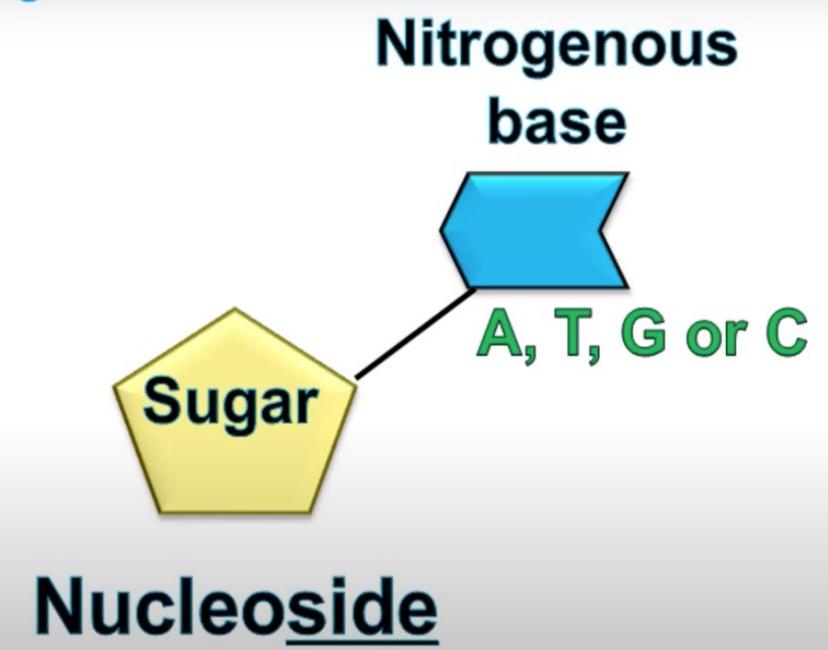
## Sanger's sequencing

### Principle

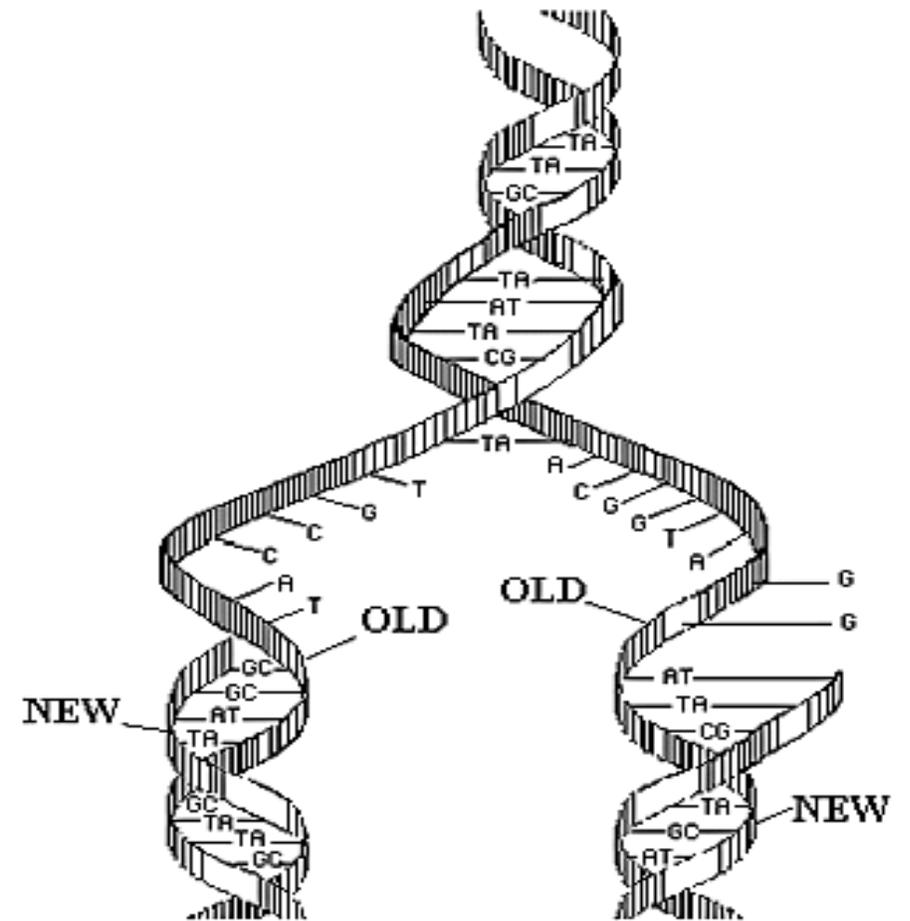
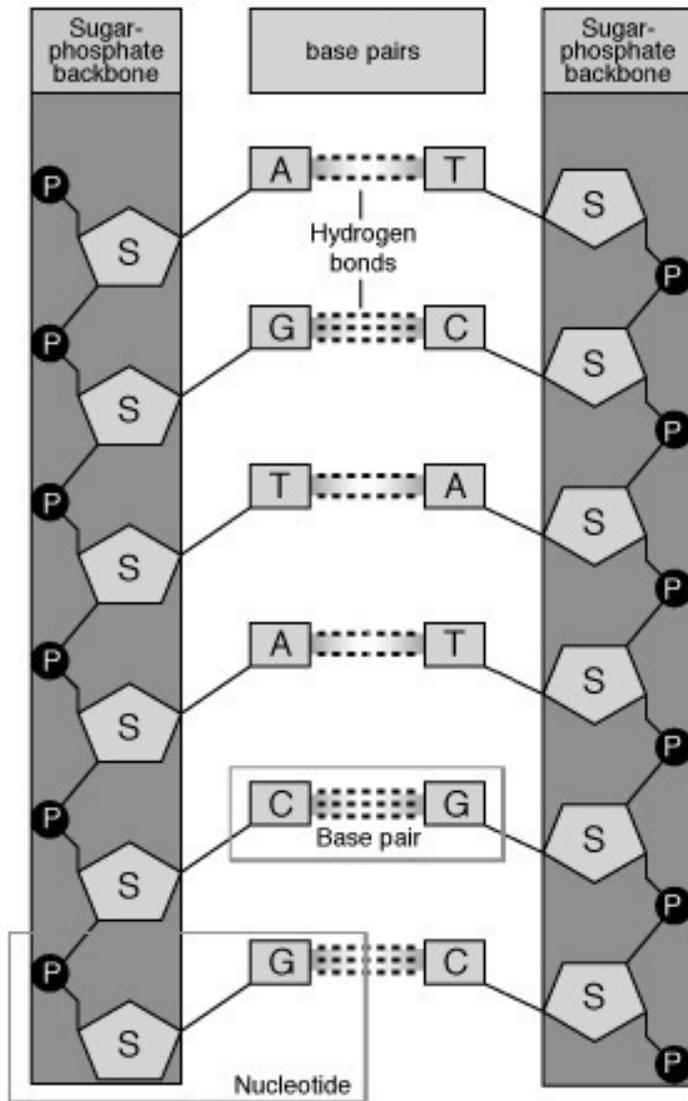


## Sanger's sequencing

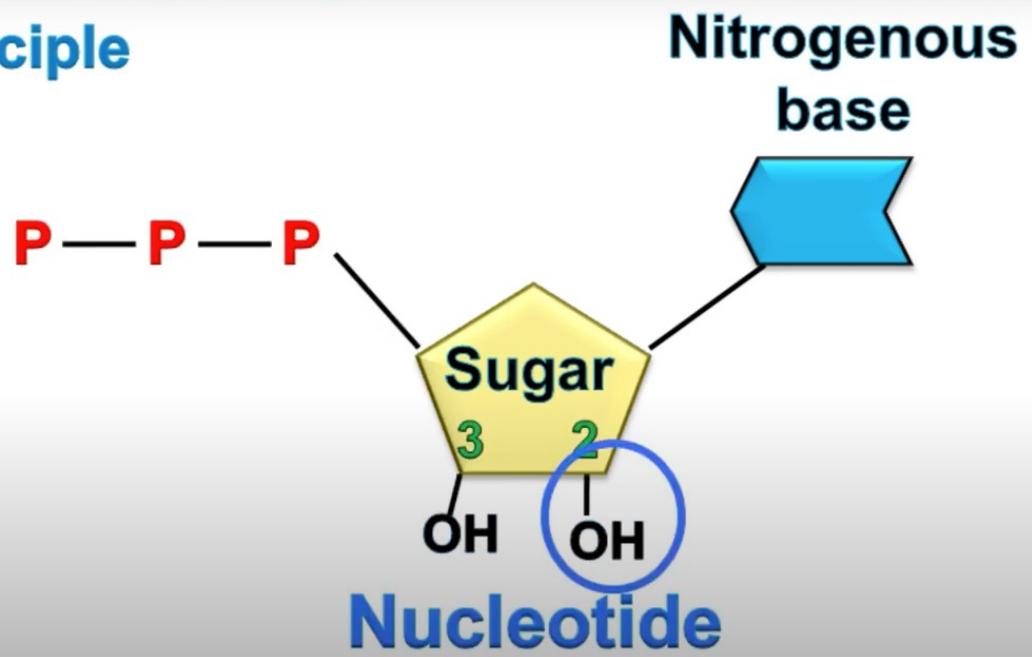
### Principle



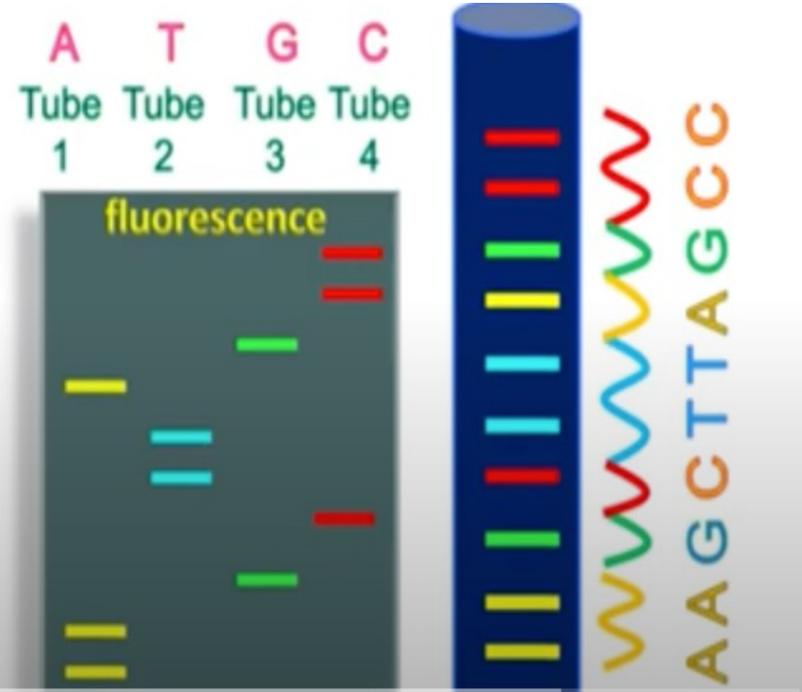
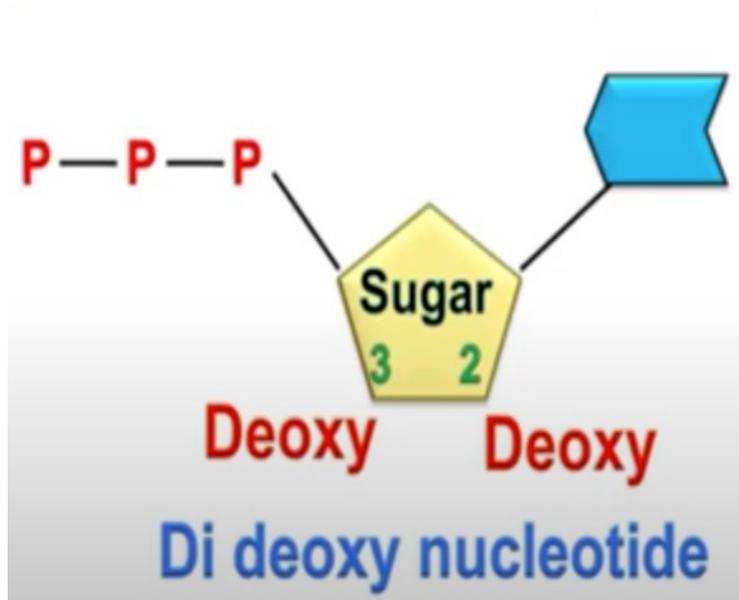
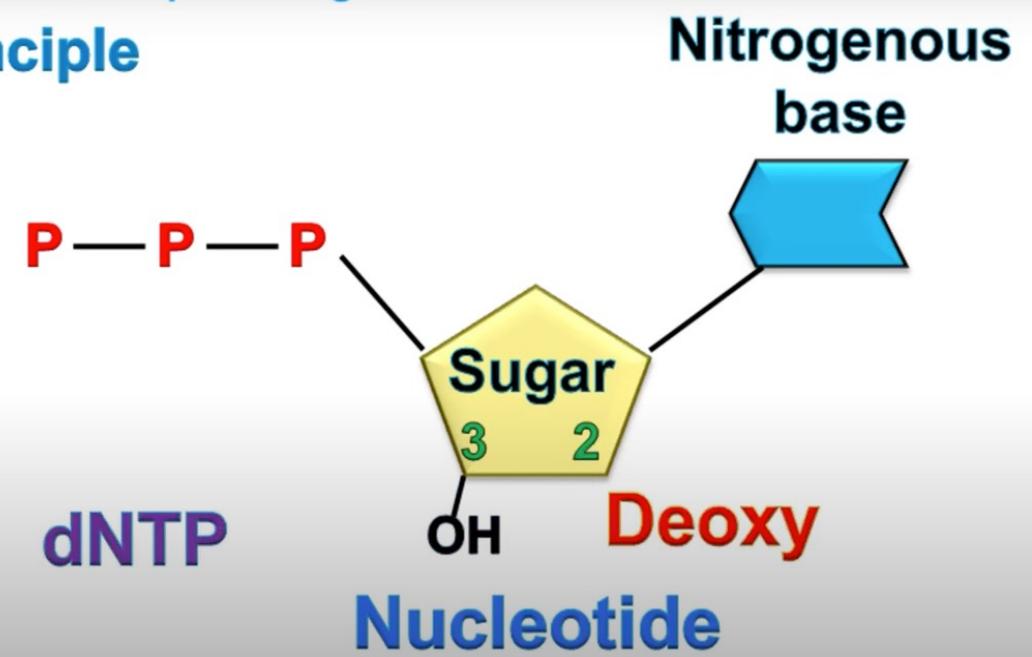
# L'ADN est un acide nucléique double brin



# Sanger's sequencing Principle



# Sanger's sequencing Principle



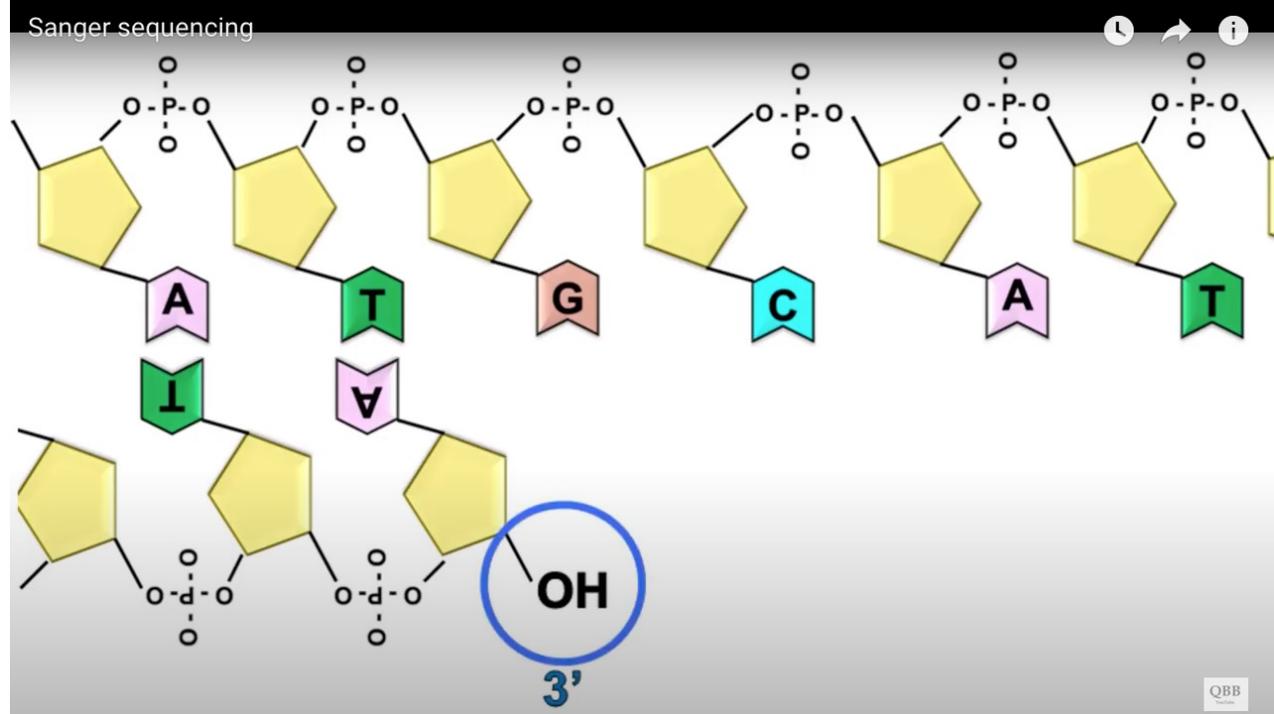
# Méthode de Fred. Sanger

C'est une technique enzymatique, elle est la plus fréquemment utilisée a été mise par Fred Sanger.

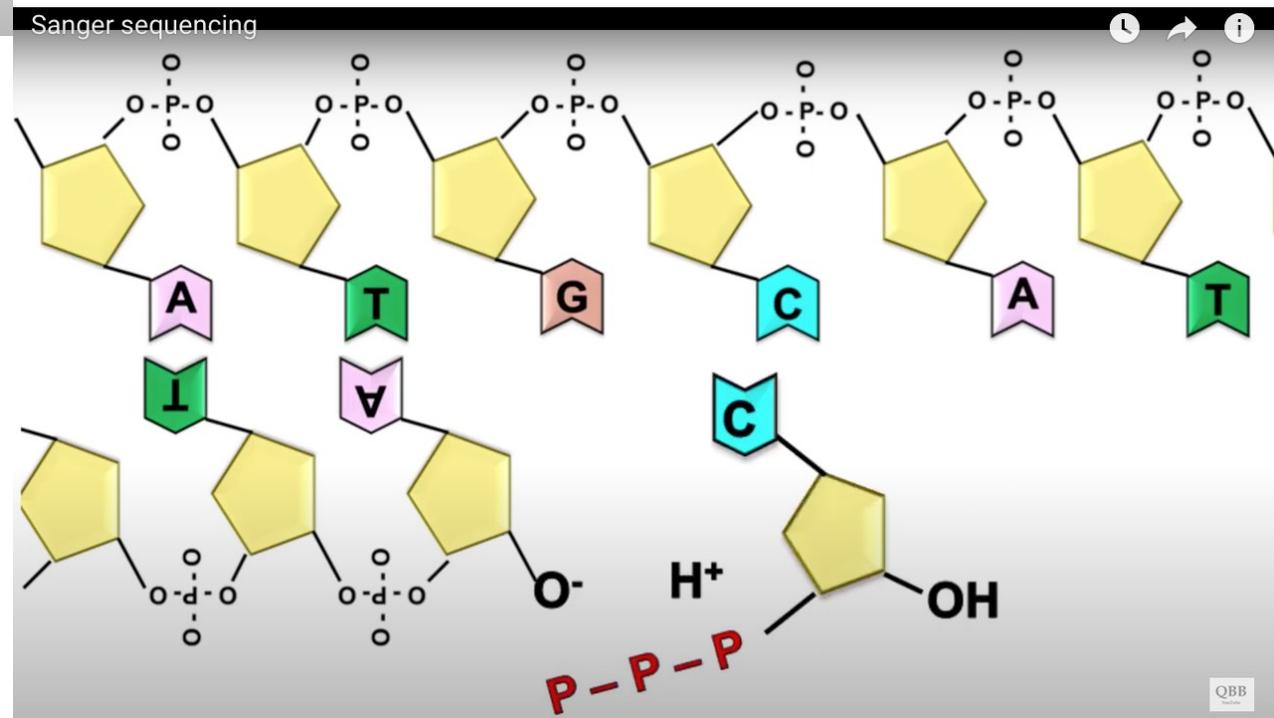
Les nucléotides sont liés les uns aux autres grâce à des liaisons phosphodiester qui se forment entre le groupement OH en position C3' du ribose du premier nucléotide et le groupement phosphate.

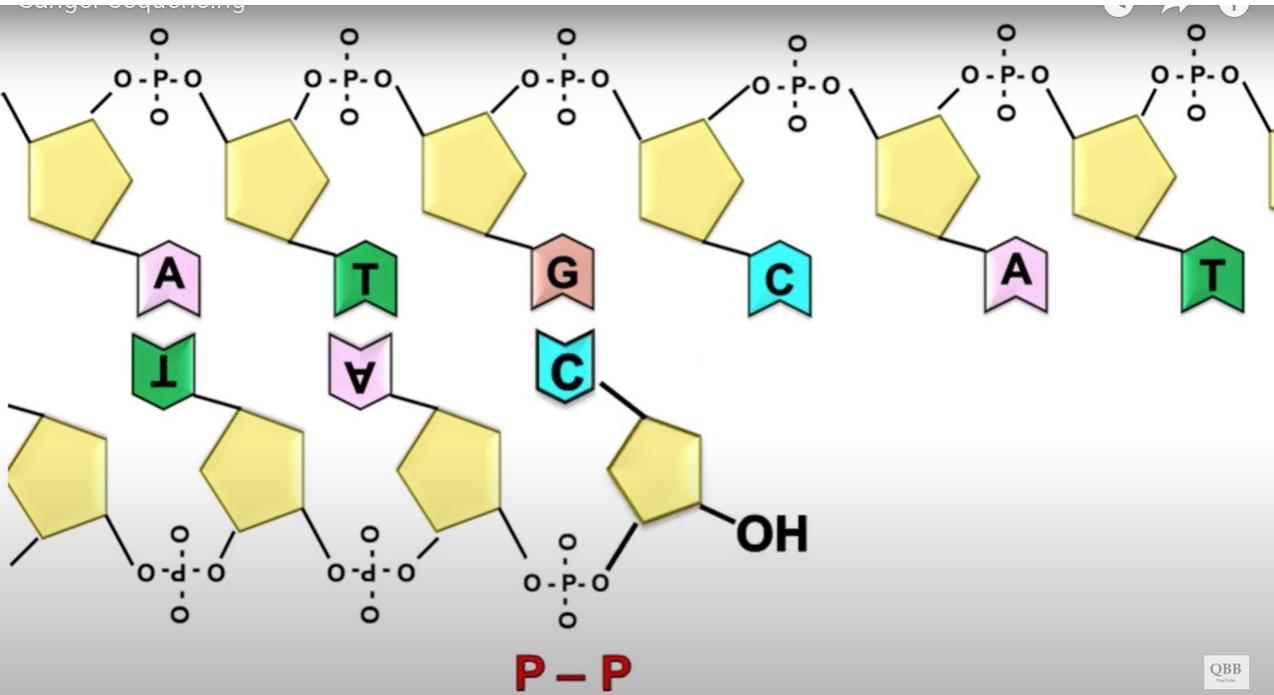
La méthode de séquençage de Sanger utilise des nucléotides didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose.

Ces ddNTP diffèrent des dNTP par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTP est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompue en position C5' du ribose du deuxième nucléotide.



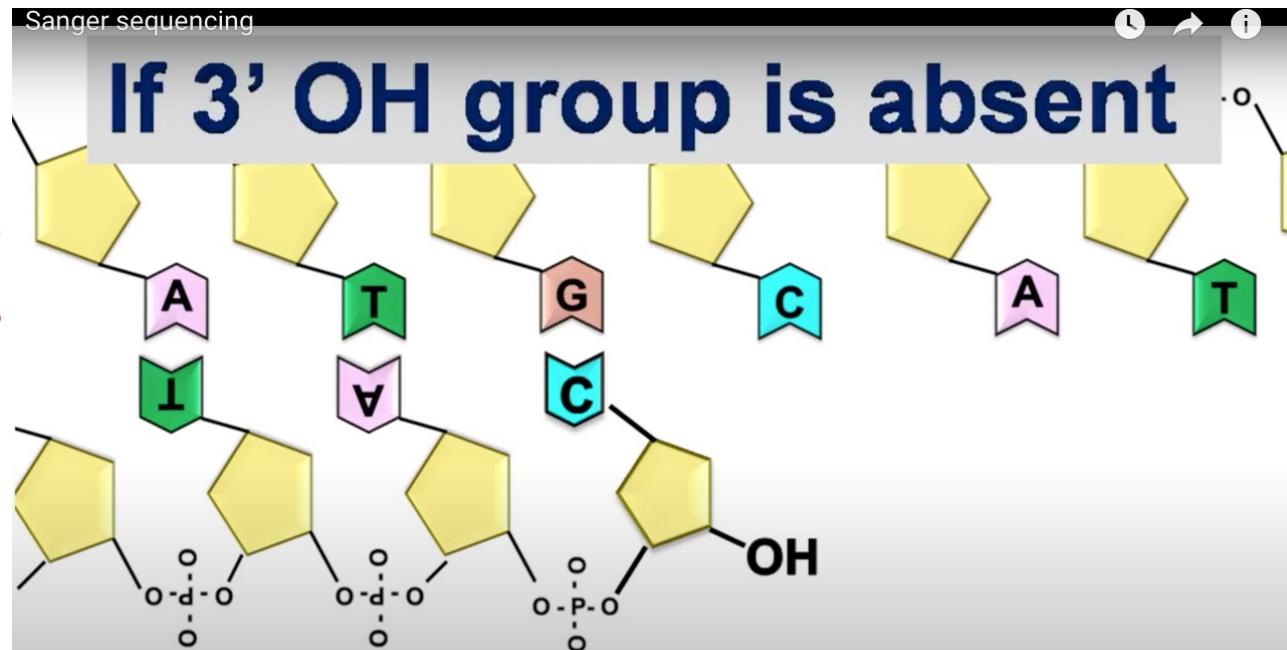
Les nucléotides sont liés les uns aux autres grâce à des liaisons phosphodiester qui se forment entre le groupement OH en position C3' du ribose du premier nucléotide et le groupement phosphate.



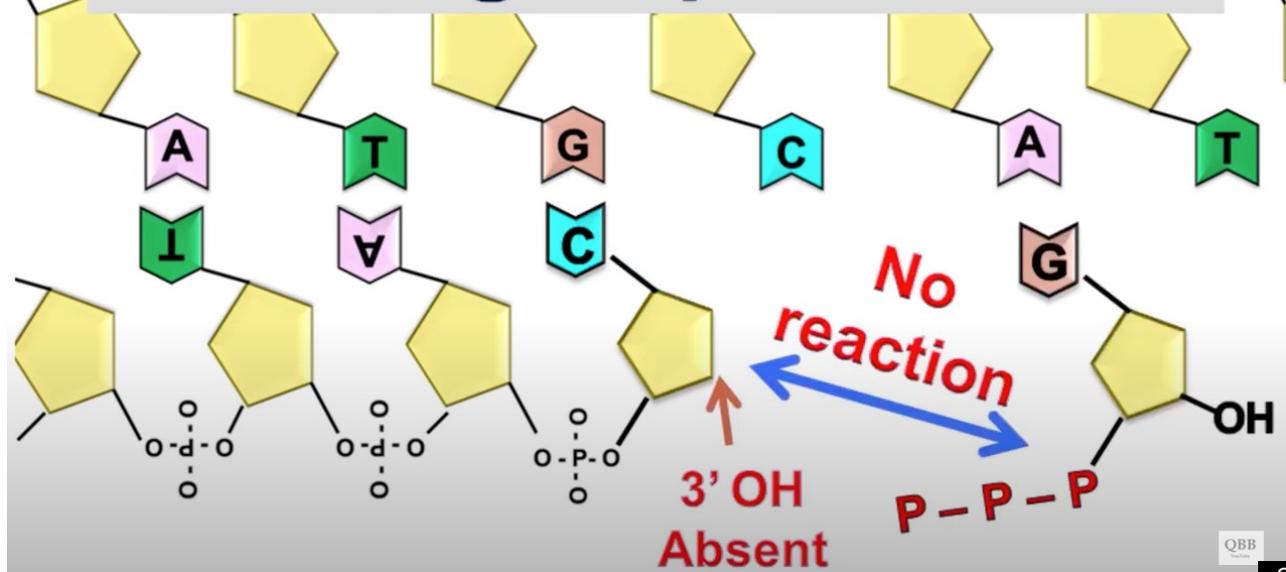


Les nucléotides sont liés les uns aux autres grâce à des liaisons phosphodiester qui se forment entre le groupement OH en position C3' du ribose du premier nucléotide et le groupement phosphate.

La méthode de séquençage de Sanger utilise des nucléotides didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose



# If 3' OH group is absent



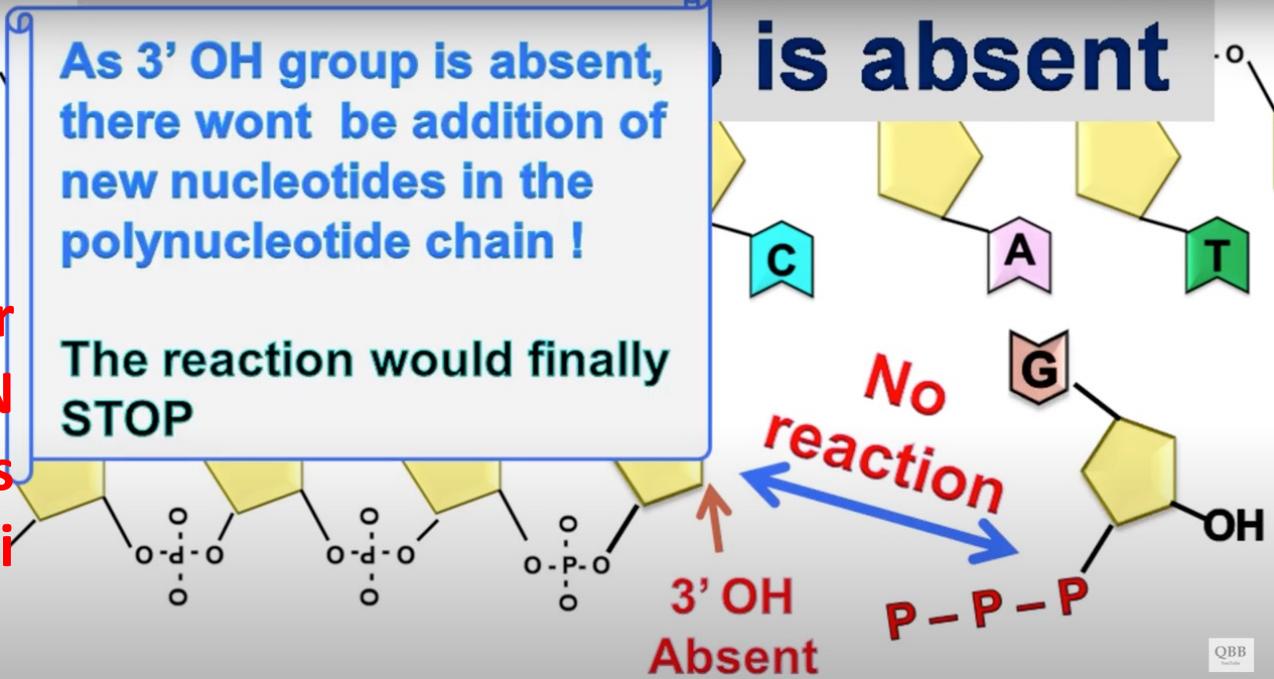
La méthode de séquençage de Sanger utilise des nucléotides didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose.

Ces ddNTP diffèrent des dNTP par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTP est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant.

L'allongement de la chaîne est alors interrompue en position C5' du ribose du deuxième nucléotide.

La réaction de Sanger repose sur l'incorporation alléatoire par cette ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel.

# is absent



## I-1 Lyse Cellulaire

Resuspendre le culot bactérien avec de tampon (50 mM Tris-Cl, pH 8 ; 10 mM EDTA, 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  RNase A). 5 min



Ajouter 200 mM NaOH ; 1 % SDS  
Incuber à t ambiante - 5 min



3 M potassium acétate, pH 5,5.- Incuber 4C

## I-2 Précipitation



Précipiter l'ADN avec 560  $\mu\text{L}$  d'isopropanol



Précipiter l'ADN avec 560  $\mu$ L d'isopropanol



Centrifuger à 18 000 g pendant 30 min.



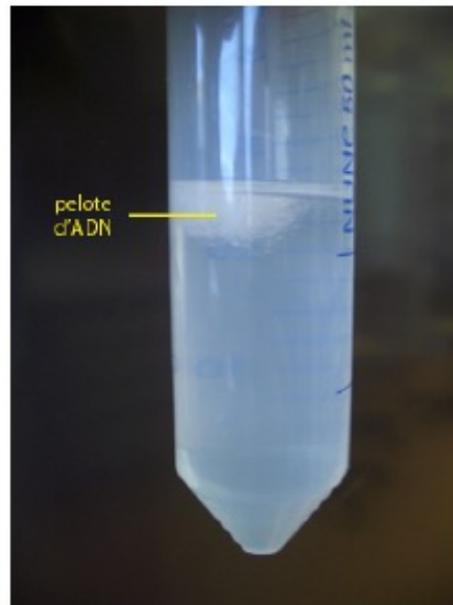
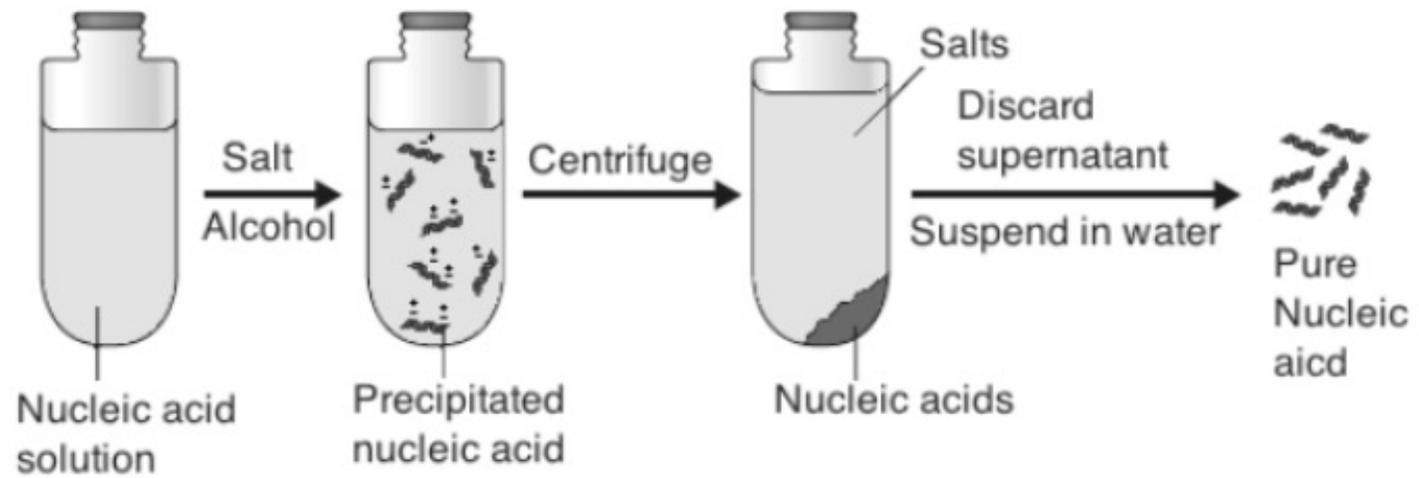
**I-3 Elution**

Laver le culot d'ADN avec 1 mL d'éthanol 70 %.



Reprendre le culot d'ADN dans 20  $\mu$ L de tampon d'extraction (10 mM Tris-Cl, pH 8 ; 1 mM EDTA)





Reprendre le culot d'ADN dans 20  $\mu$ L de tampon d'extraction (10 mM Tris-Cl, pH 8 ; 1 mM EDTA)



/56-FAM/CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT  
CCC CCT TTT CCC

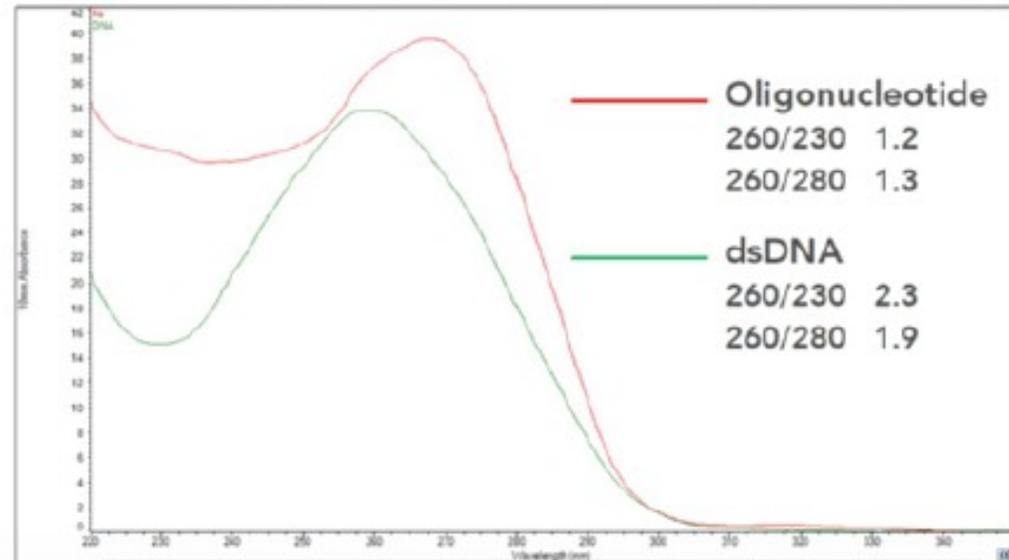


Figure 3. Le spectre d'UV d'un oligonucléotide pur.

### **Ratio A260/A280 :**

- un ratio de 1,80 (+/- 0,1) permet de qualifier une extraction d'ADN comme pure, ce ratio se situe autour de 2,0 pour une extraction d'ARN (+/- 0,1).
- Si ce ratio est inférieur cela signifie que l'extraction est polluée par des protéines et/ou des composés phénoliques

### **Ratio A260/A230 :**

- la valeur attendue de ce ratio se situe entre 2,0 et 2,20.
- Si ce ratio est plus faible cela indique nécessairement qu'un composé absorbe à 230 nm.
- Ces composés peuvent le plus souvent être de l'EDTA, des sucres, et encore une fois le phénol et particulièrement le TRIzol reagent.

Ces valeurs de ratios peuvent parfois être négligées, cependant elles donnent une indication quant à la présence d'éventuels inhibiteurs qui viendraient perturber le devenir de vos acides nucléiques (PCR et autres réactions enzymatiques). Il est important de réaliser une valeur de blanc sur la solution qui vous aura servi à éluer vos acides nucléiques (car comme il a été précédemment mentionné l'EDTA absorbe à 230 nm... et bien souvent le TE 1X sert à reprendre et conserver des acides nucléiques

### **Ethanol ou Isopropanol ? Utilisez l'éthanol si :**

1. Vous avez l'espace nécessaire pour mettre deux volumes d'éthanol à l'échantillon dans votre tube.
2. L'échantillon doit être stocké pendant une longue période de temps.
3. Vous avez besoin de précipiter de très petits fragments d'ADN.

### **Utilisez l'isopropanol si :**

1. Le volume de votre échantillon est important et vous ne pouvez mettre qu'un volume de solvant dans votre tube.
2. Vous avez besoin d'espèces de grand poids moléculaire.
3. La concentration d'ADN dans votre échantillon est faible.
4. Vous êtes pressé et voulez accélérer la précipitation des acides nucléiques à la température ambiante.

### **Précipitation à l'éthanol :**

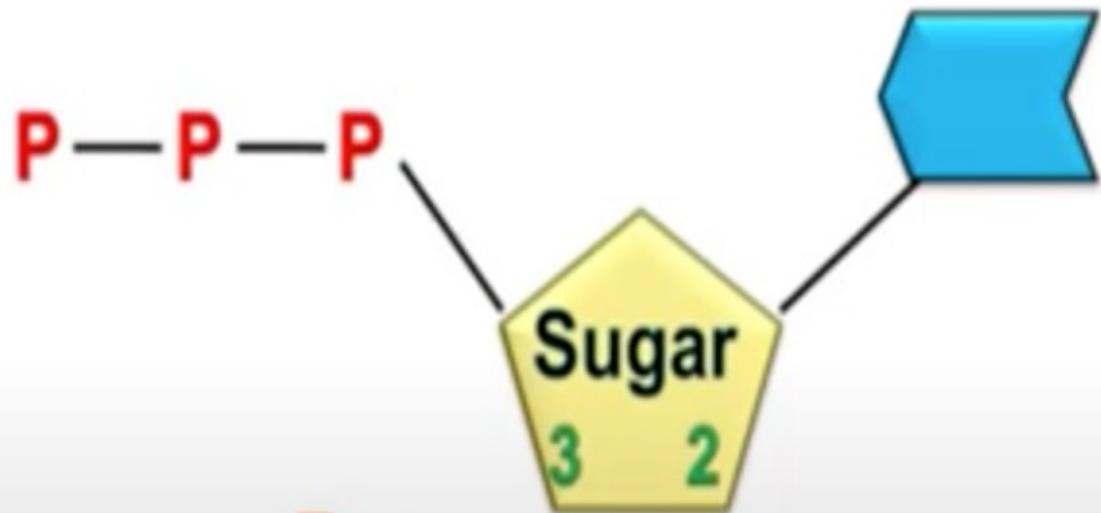
- Ajouter 60% volumes d'éthanol à l'échantillon et congeler à -20°C pendant au moins 1 heure ou toute la nuit pour de meilleurs résultats.
- Centrifuger l'échantillon à pleine vitesse (20 000 g) pendant 20 minutes pour recueillir tout le matériel.
- Laver avec de l'éthanol à 70 %, puis centrifuger pendant 10 à 15 minutes pour éliminer l'ADN.
- Laissez-le sécher à l'air libre ou utilisez un évaporateur centrifuge (5 minutes suffisent), puis remettez-le en suspension dans le tampon.

### **Précipitation d'isopropanol :**

- Éviter les températures froides en raison de la précipitation excessive de sel qui peut se produire.
- Pour augmenter les rendements précipités, incuber le mélange d'échantillons à température ambiante pendant 15 minutes.
- Le culot est parfois plus difficile à voir que le culot d'éthanol.
- Après le lavage à l'éthanol, le culot devient visible et blanc.
- Assurez-vous qu'il ne glisse pas sur le côté de la paroi du tube avant de décanter le surnageant.
- Laissez-le sécher à l'air libre ou utilisez un évaporateur centrifuge (5 minutes suffisent), puis remettez-le en suspension dans le tampon.

## Di deoxy nucleotides

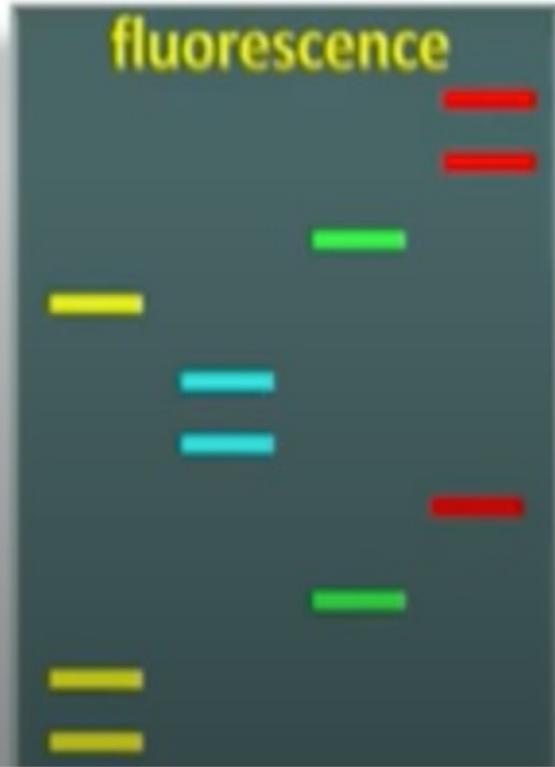
Après purification, L' ADN peut être séquencé en utilisant une polymérase qui synthétise un brin complémentaire à partir d'un brin matrice du fragment d'ADN d'intérêt ; quand la polymérase incorpore un des quatre « didésoxynucléotides » (ddATP, ddCTP, ddGTP, ou ddTTP présents séparément dans quatre réactions individuelles), la synthèse s'arrête. Cela génère un mélange de molécules qui se terminent à chaque position où se trouve un A, un C, un G, ou un T (selon le type de didésoxynucléotide présent). Les fragments dans ce mélange sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel. La connaissance du didésoxynucléotide qui a été incorporé dans chaque réaction permet ainsi de déduire la séquence du fragment d'ADN d'intérêt.



Deoxy Deoxy

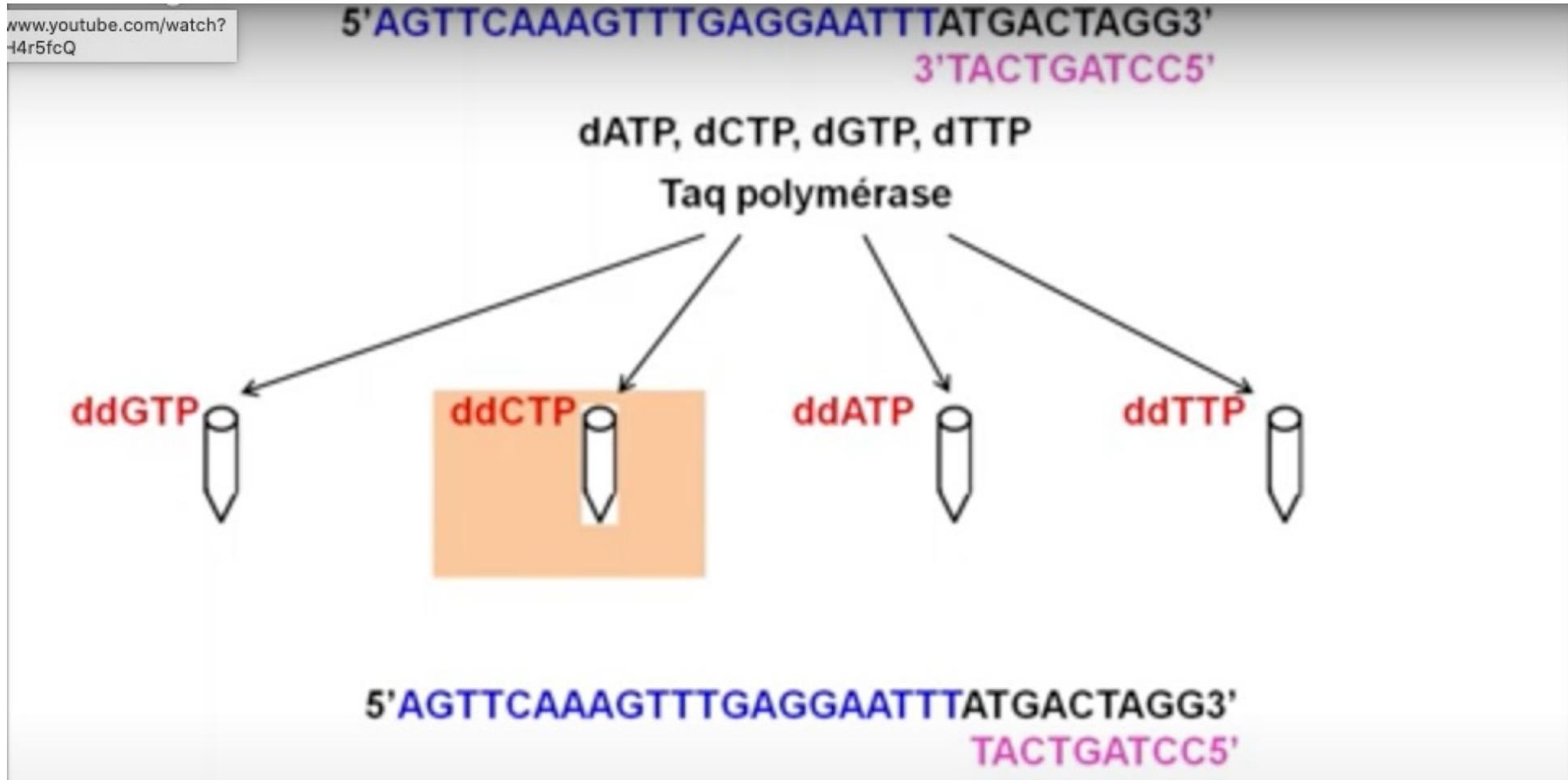
Di deoxy nucleotide

A T G C  
 Tube Tube Tube Tube  
 1 2 3 4



Wavy line representing a DNA strand with the sequence: AAGCTTAGCC

Préparation d'une grande quantité d'ADN (~1mg via miniprep)  
Dénaturation et ajout de l'amorce, des 4 dNTP (dont 1 radioactif, S<sup>35</sup> ou P<sup>32</sup>) et de l'ADN polymérase  
Faire 4 aliquots et mettre un peu de ddNTP dans chaque tube  
Elongation et terminaison par incorporation de didéoxynucléotides spécifiques.

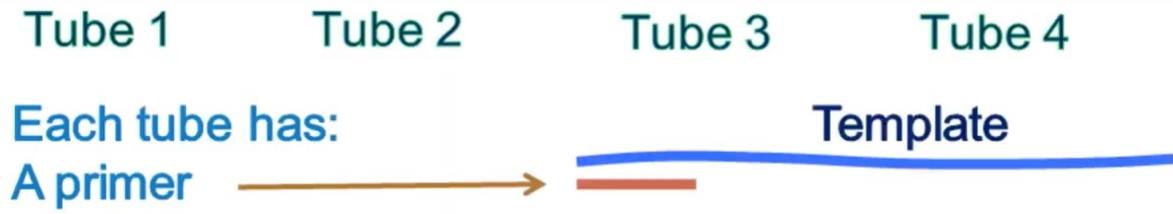


# Sanger's sequencing



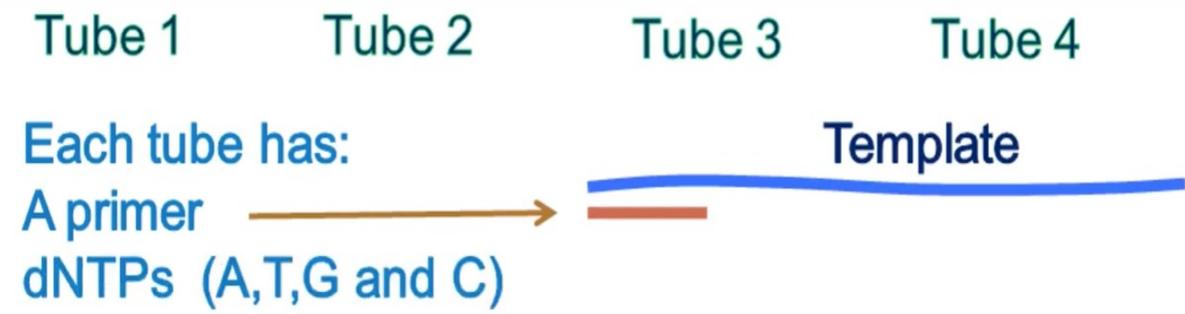
A)

# Sanger's sequencing



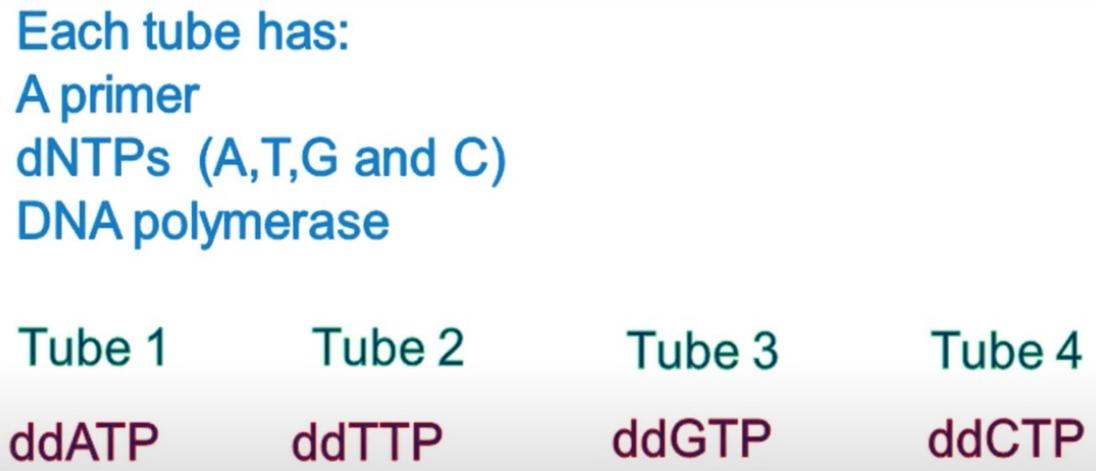
B)

# Sanger's sequencing



C)

# Sanger's sequencing

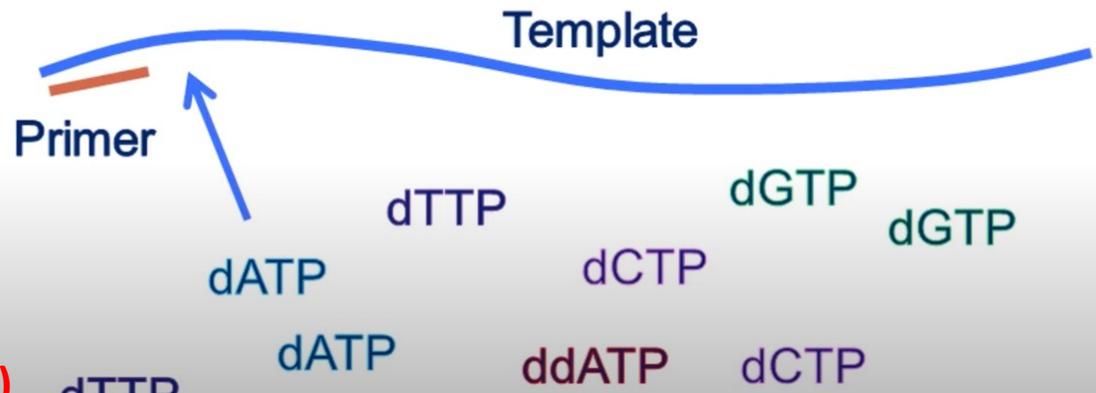


D) dd = di deoxy

### Sanger's sequencing

Tube 1  
ddATP

Each tube has:  
A primer  
dNTPs (A,T,G and C)  
DNA polymerase

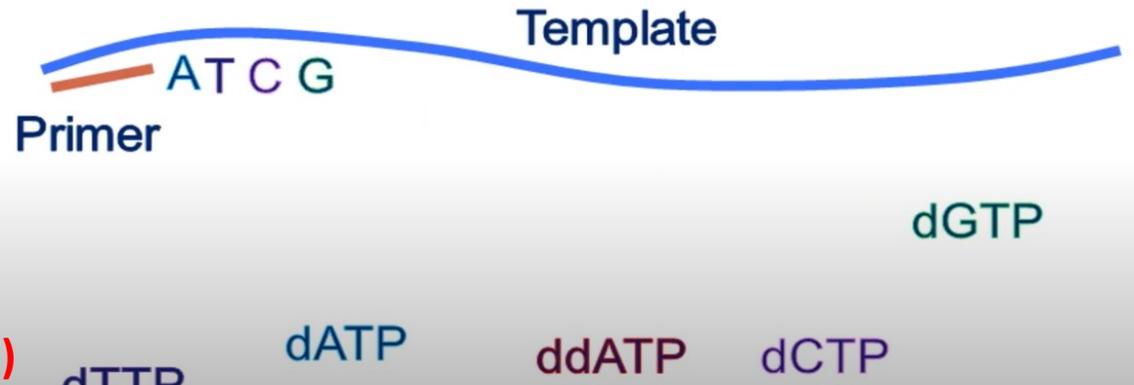


E)

### Sanger's sequencing

Tube 1  
ddATP

Each tube has:  
A primer  
dNTPs (A,T,G and C)  
DNA polymerase

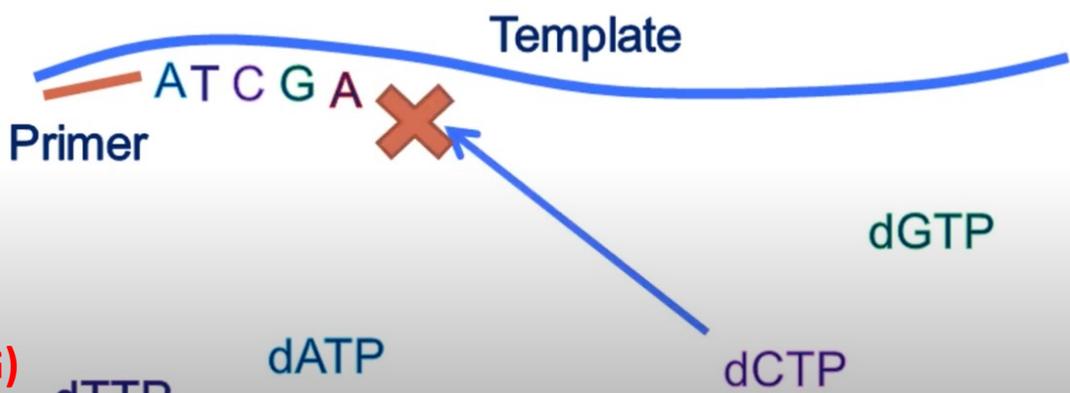


F)

### Sanger's sequencing

Tube 1  
ddATP

Each tube has:  
A primer  
dNTPs (A,T,G and C)  
DNA polymerase

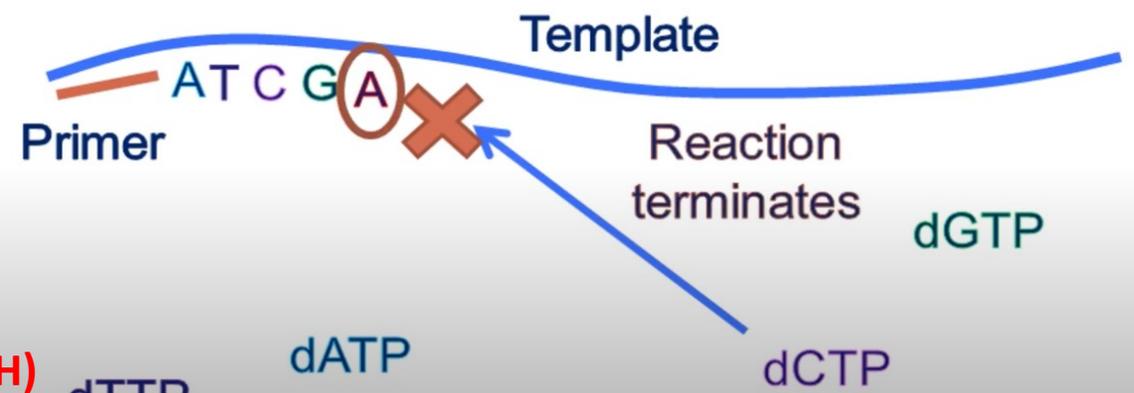


G)

### Sanger's sequencing

Tube 1  
ddATP

Each tube has:  
A primer  
dNTPs (A,T,G and C)  
DNA polymerase

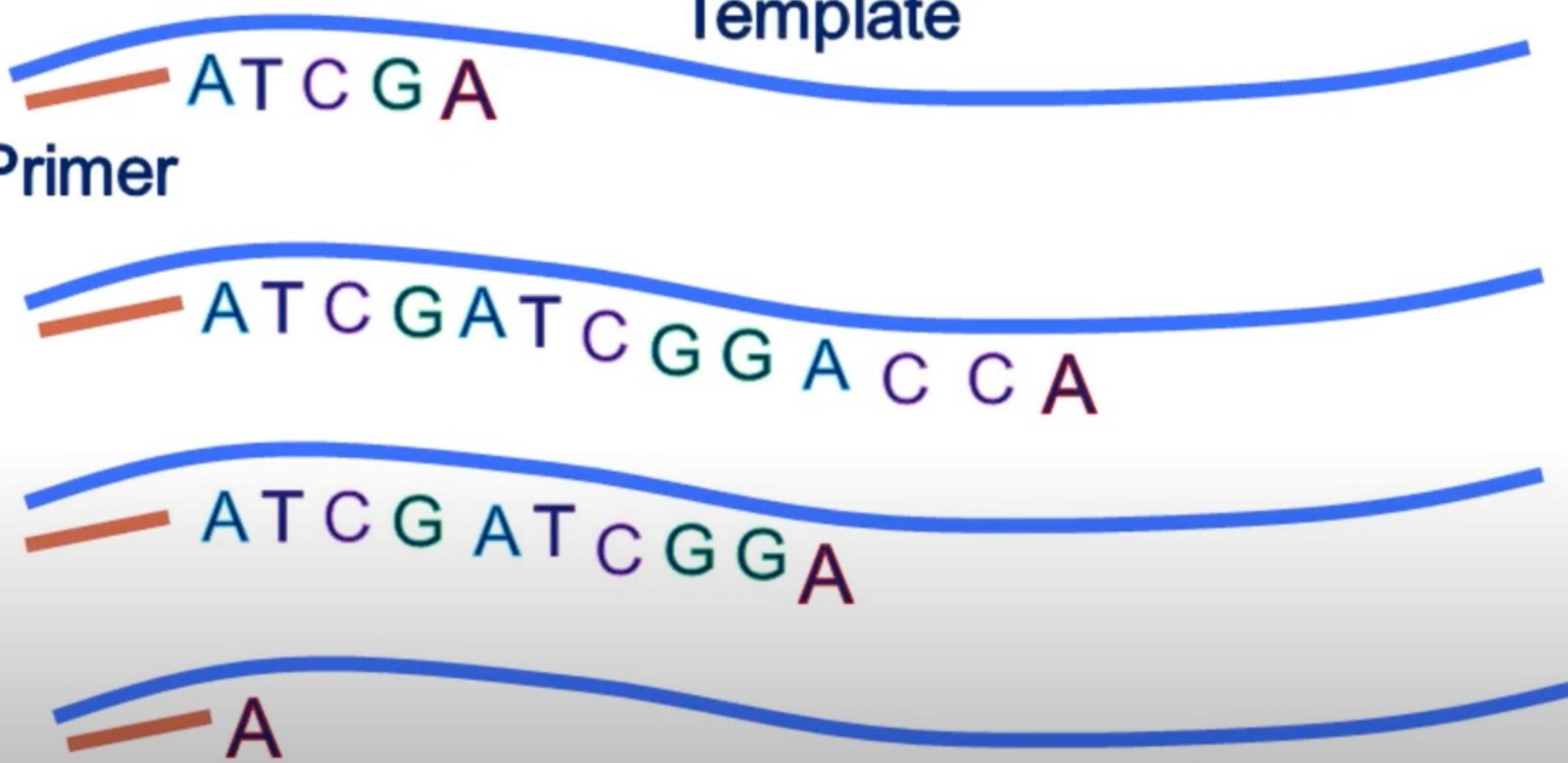


H)

Tube 1 ddATP

Template

Primer



## Tube 1 ddATP

— ATCGA  
←→ 5 bases

— ATCGATCGGACCA  
←→ 13 bases

— ATCGATCGGA  
←→ 10 bases

— A

# Tube 1 ddATP

— AT C G **A** 5<sup>th</sup> Base = A  
←→ 5 bases

— AT C G A T C G G A C C **A** 13<sup>th</sup> Base = A  
←→ 13 bases

— AT C G A T C G G **A** 10<sup>th</sup> Base = A  
←→ 10 bases

— A

## Sanger sequencing

Tube 1 ddATP

Tube 2 ddTTP

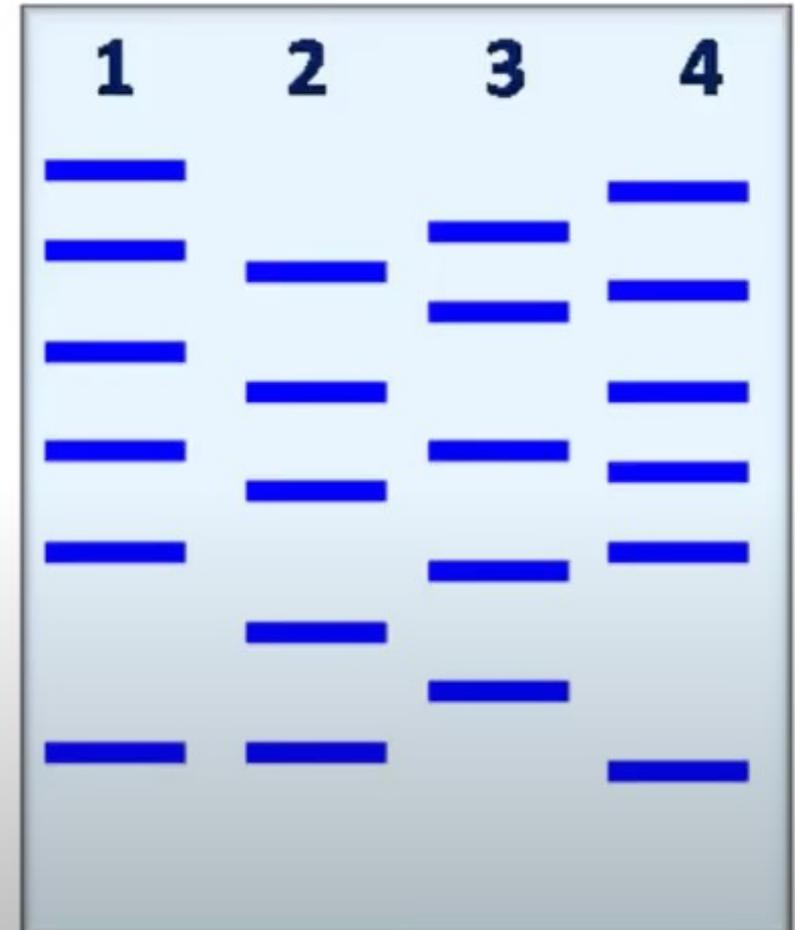
Tube 3 ddGTP

Tube 4 ddCTP

Les fragments dans ce mélange sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel. La connaissance du didésoxynucléotide qui a été incorporé dans chaque réaction permet ainsi de déduire la séquence du fragment d'ADN d'intérêt.

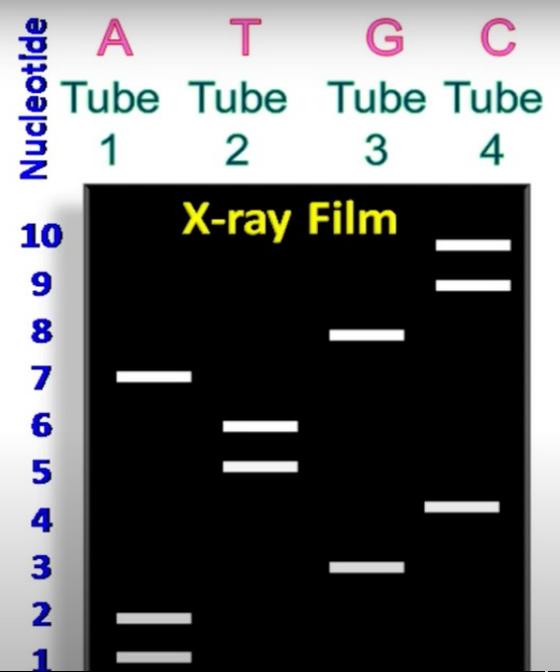
## Sanger sequencing

Tube 1 Tube 2 Tube 3 Tube 4



Sanger sequencing

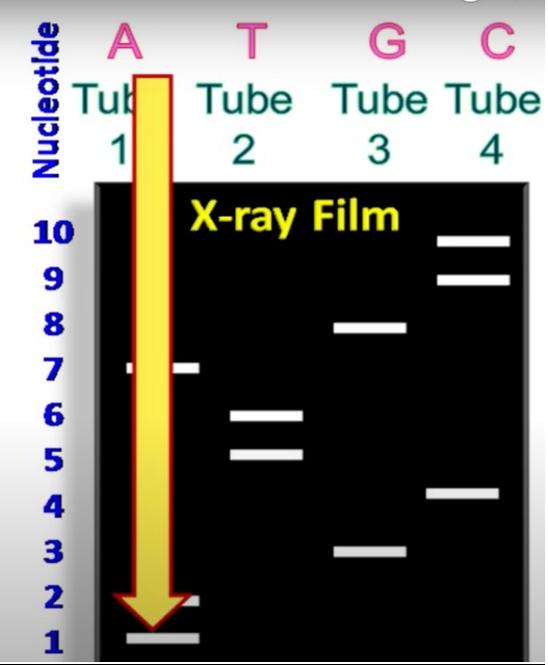
- Tube 1 ddATP
- Tube 2 ddTTP
- Tube 3 ddGTP
- Tube 4 ddCTP



A)

Sanger sequencing

- Tube 1 ddATP
- Tube 2 ddTTP
- Tube 3 ddGTP
- Tube 4 ddCTP

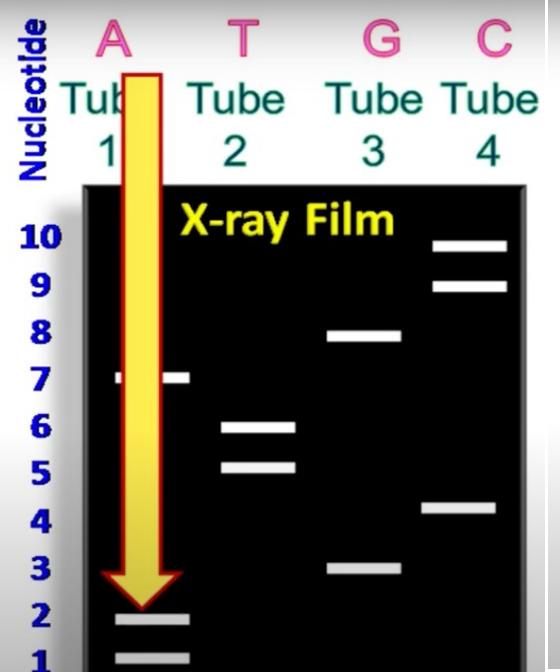


B)

Lire (k)

Sanger sequencing

- Tube 1 ddATP
- Tube 2 ddTTP
- Tube 3 ddGTP
- Tube 4 ddCTP

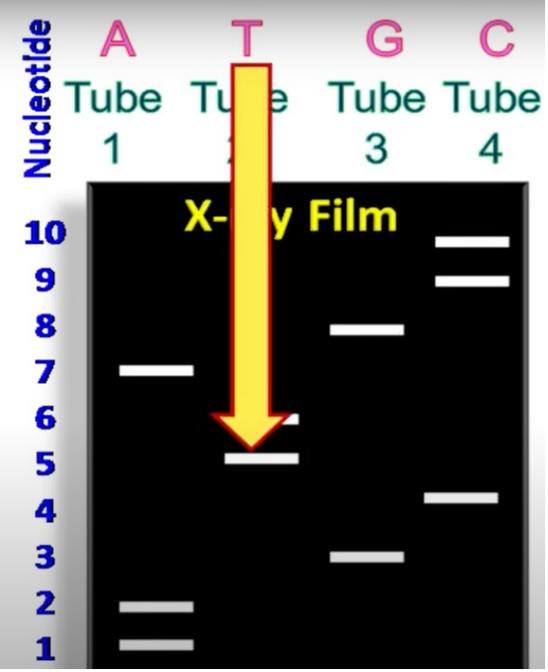


AA

C)

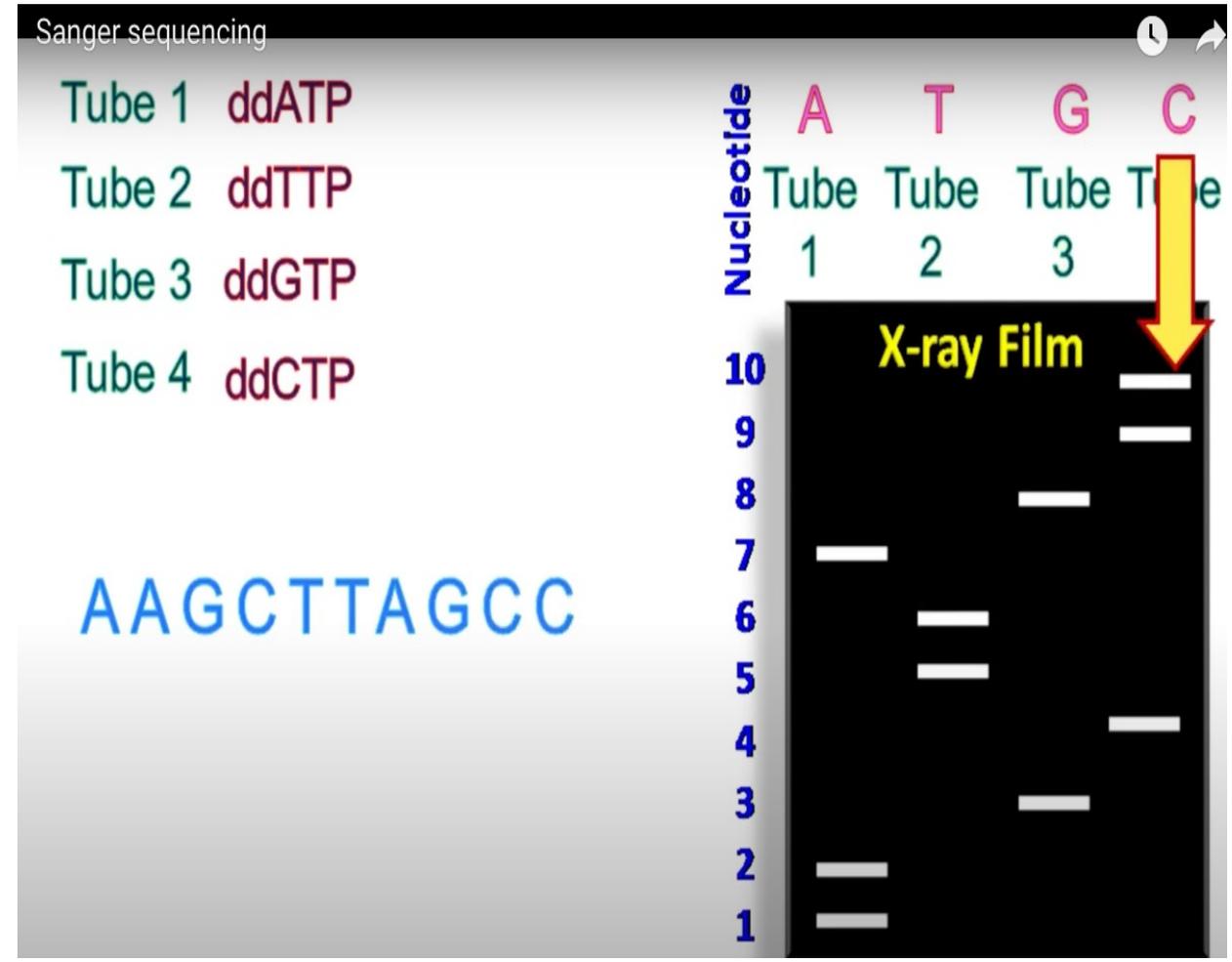
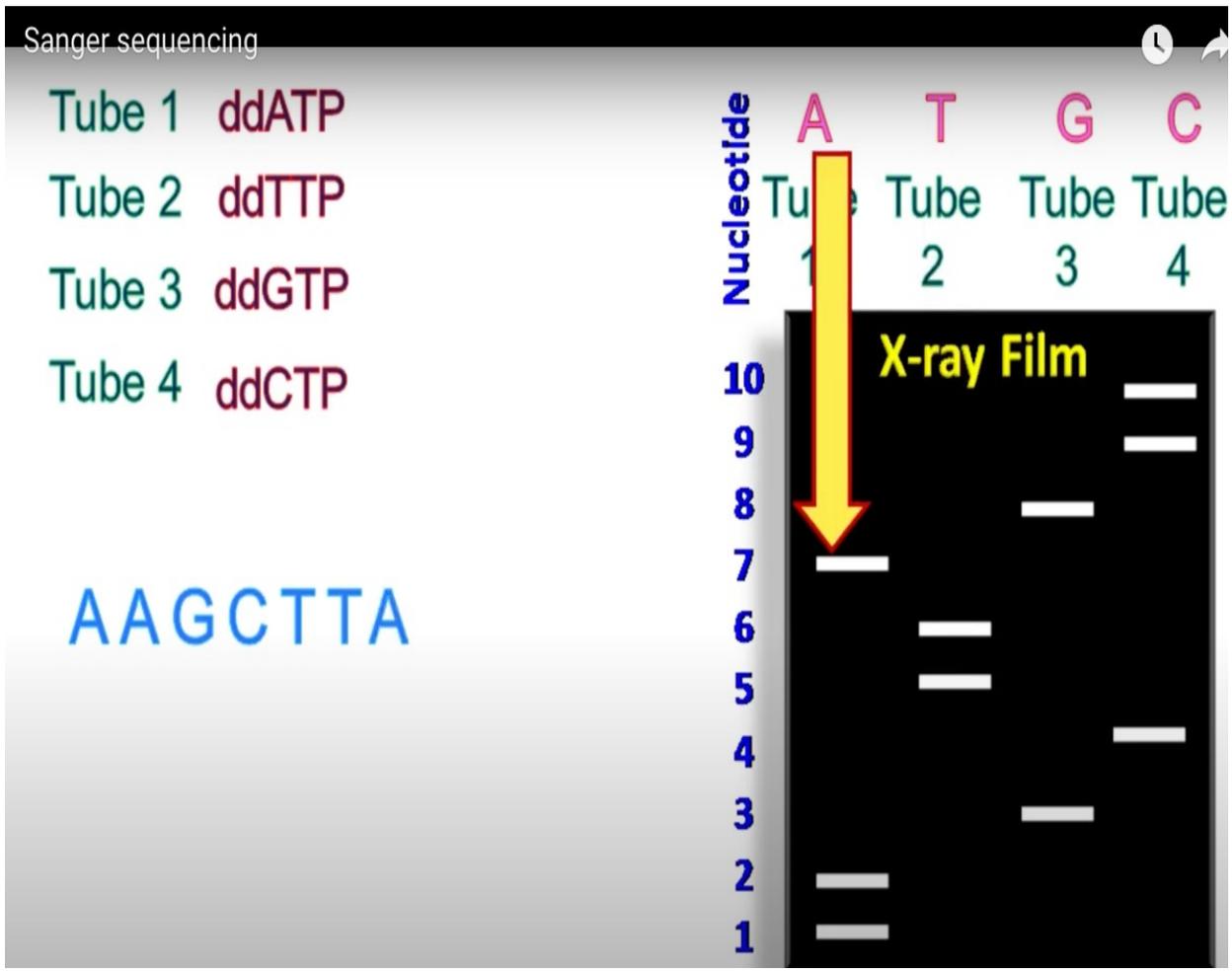
Sanger sequencing

- Tube 1 ddATP
- Tube 2 ddTTP
- Tube 3 ddGTP
- Tube 4 ddCTP



AAGCT

D)



# **Modern Sanger Sequencing**

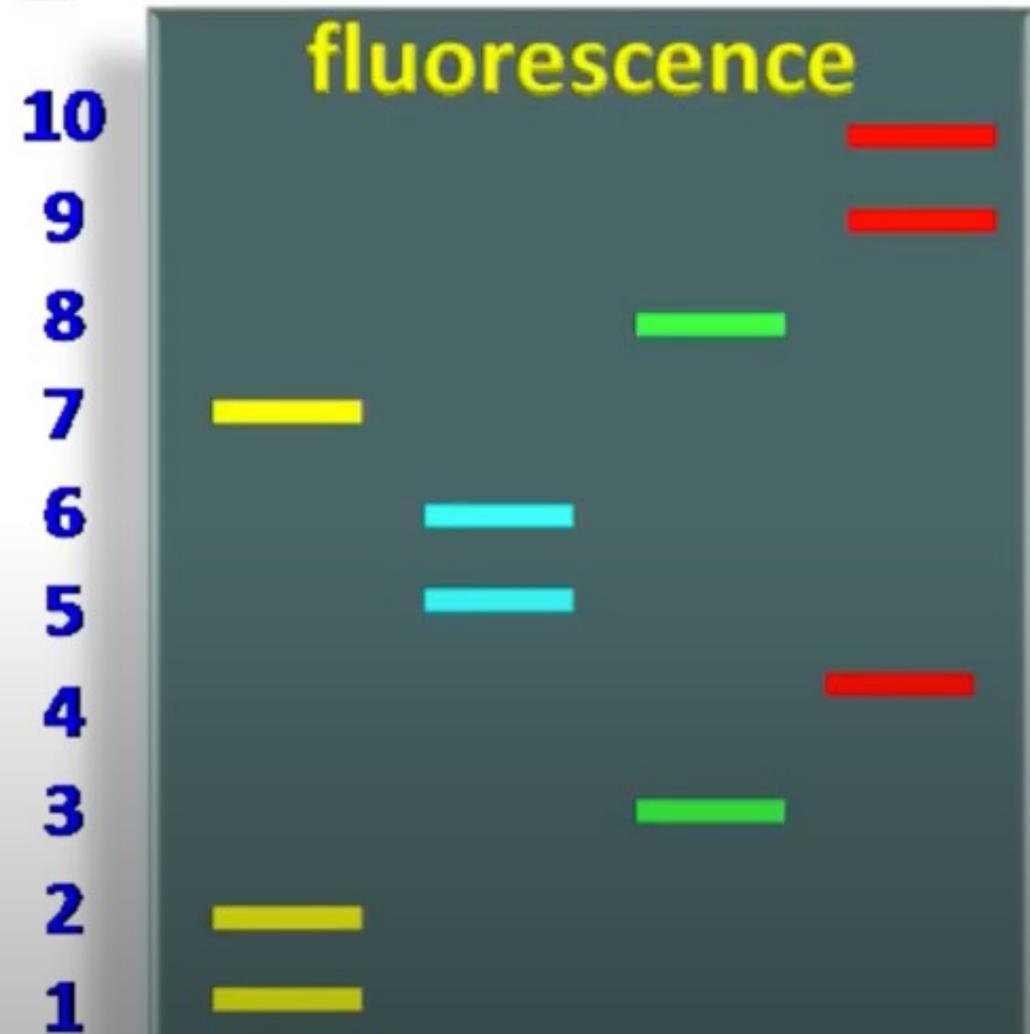
**(Uses Taq DNA polymerase)**

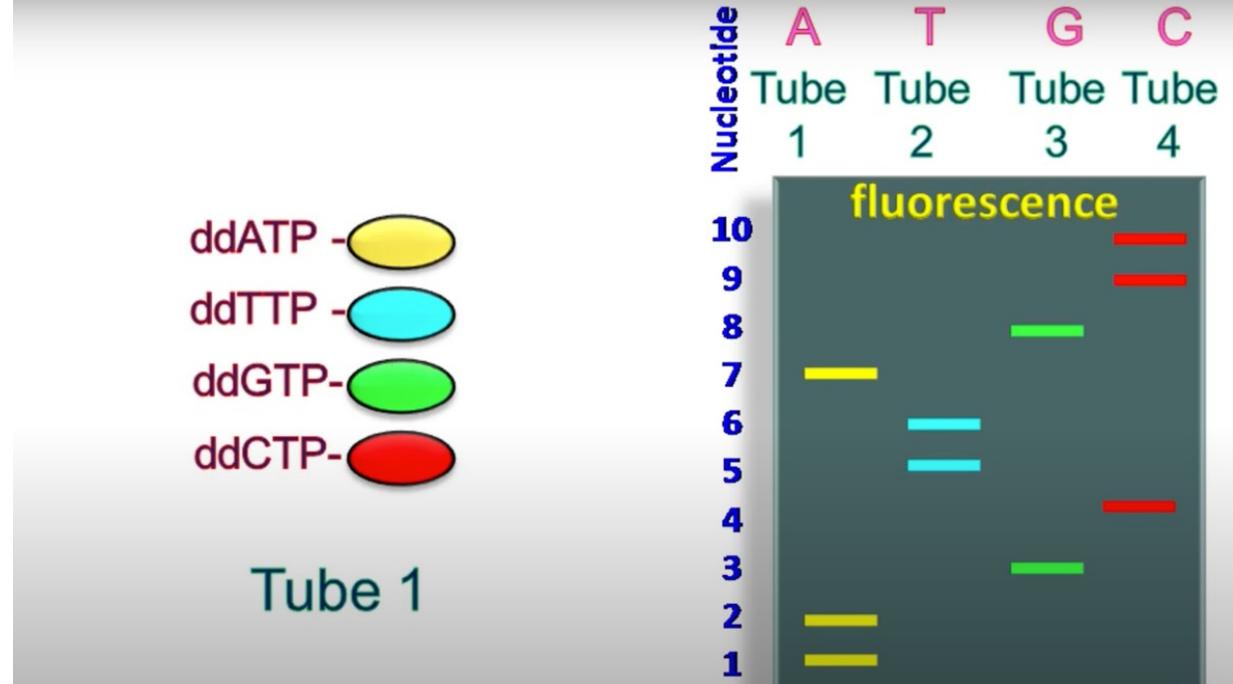
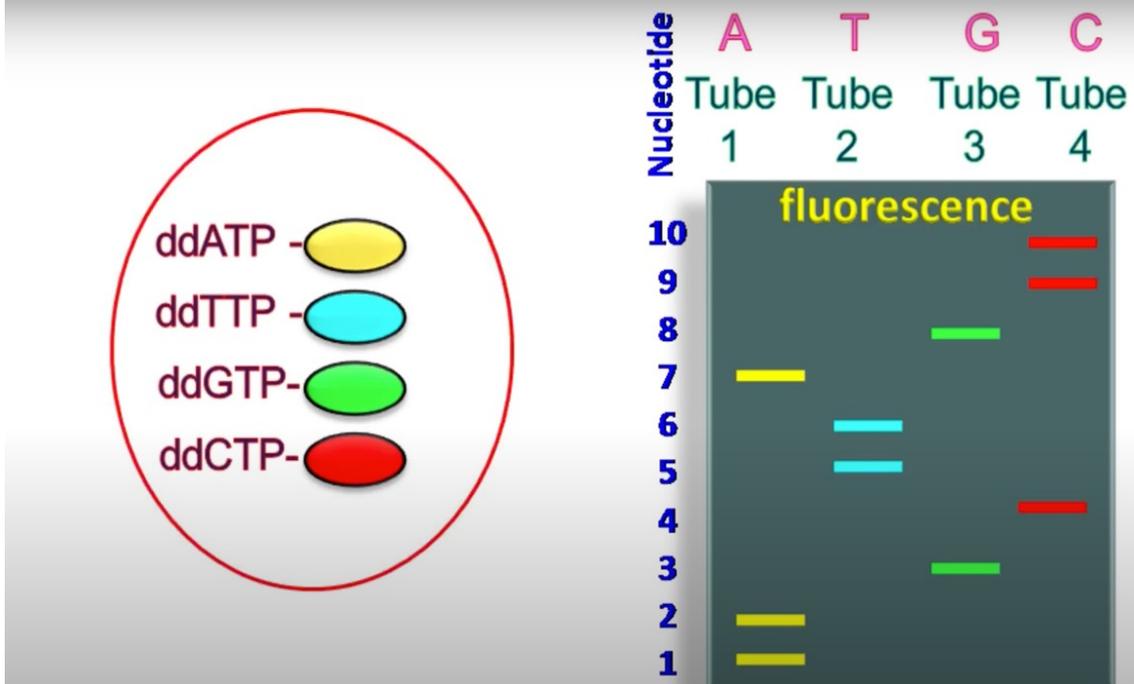


- Tube 1 ddATP - 
- Tube 2 ddTTP - 
- Tube 3 ddGTP - 
- Tube 4 ddCTP - 

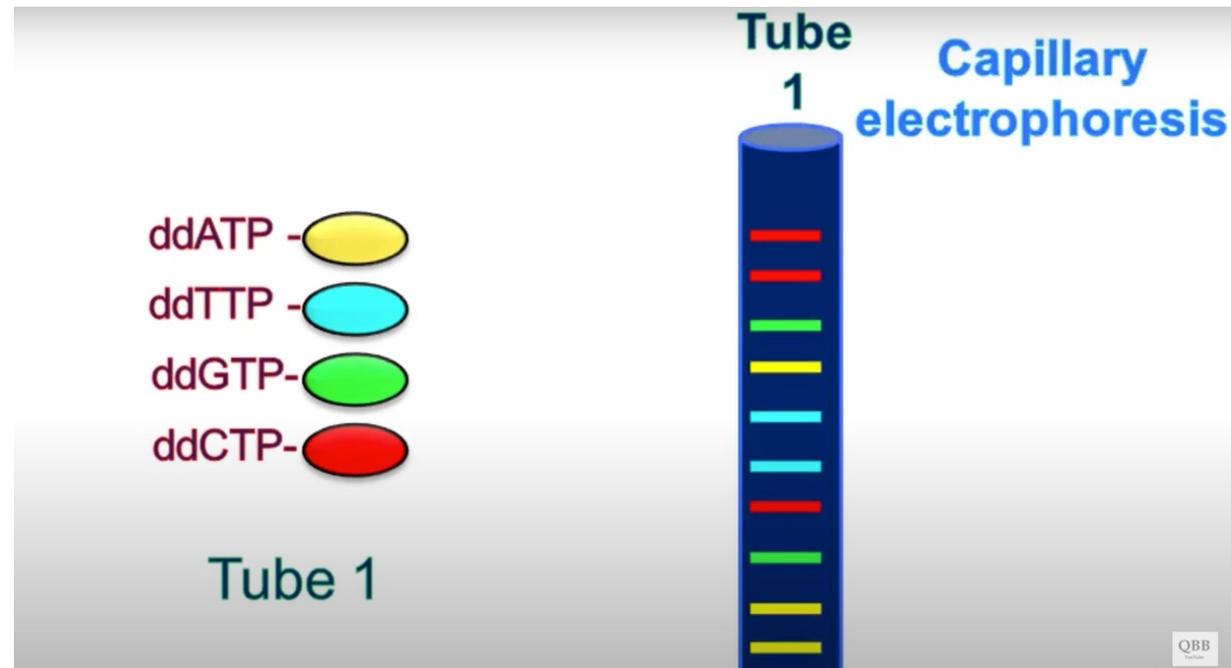
**Nucleotide**

	A	T	G	C
Tube 1				
Tube 2				
Tube 3				
Tube 4				





- Ces ddNTP sont chacun marqués par un fluorochrome spécifique . Quatre fluorochrome différents qui émettent, apres excitation par un faisceau laser des fluorescences de couleurs différentes.
- Chacune de ces couleurs physiques est convertie en une couleur informatique par un logiciel de traitement de ces différents fluorescences.



- ddATP - 
- ddTTP - 
- ddGTP - 
- ddCTP - 

Tube 1

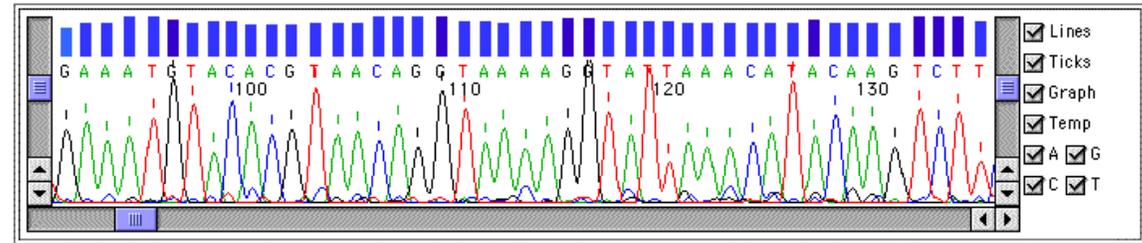
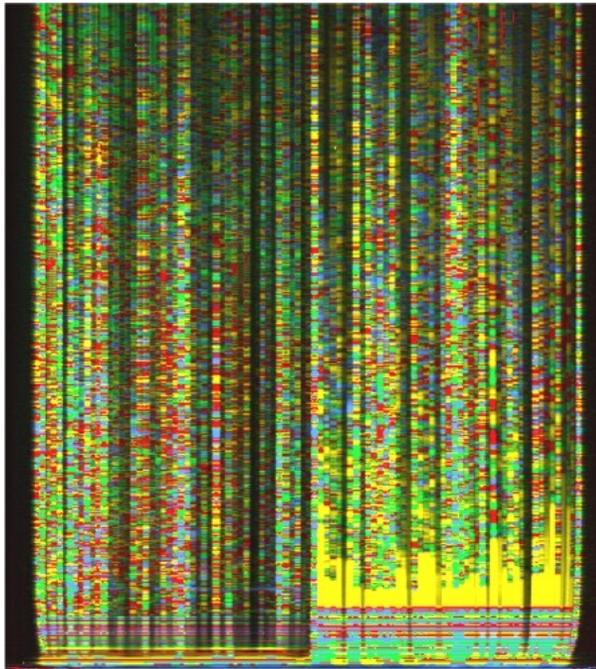
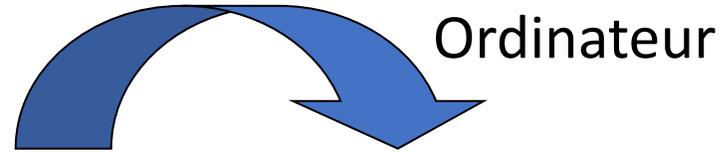
Tube  
1

Capillary  
electrophoresis



CCD  
(Charged Coupled Device)

# Séquençage automatique



```
AGCAAAGCAAGACGCTGGAGGGGGCCGCTCTAAATAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAAT
TCGGCACGAGATTTCAATGACAAAACCTGTTGAAATGTACACGTAACAGGTAAAAGGTAT
TAAACATACAAGTCTTCTGATTCCTTAGAAAAAGAAGTCGTCGTCGTCGTCCTTCTTGCT
TTGTAATAGTTATAAACCCCTCGAAGAGCTTAGTGTTCGAACAGCAGGTGGTACAGGGAAT
CCGTCCTTCACTCTTTGACTGAGCGAATCCAAGACGAGCTTGTCCAATGTGCAATATGGTG
TAGTACCTCCCAATGAAGACGCTCTCCAAGAATCCATAGTTCACCGATTCTCTCGGGGAAG
TCCATGCCCCATAAAGCCAGACAAAACAACTGTTTTTCCACCTGCTTTCACACTTAAGACG
TAGTCCTCTCCTTTCAGGGTGAAGGTCTTGCCTTCGATCACAATGATATTTTCAGGAAGA
GTTGGGACTTTGTGCATGGAATCATGTACTCTCCCTTATGAGTGGCTCAGCTCCGATG
AACTTCTGAATCGCTTCTTACTTGAGCTTTTGGACCAGCAATCAGCGATGTGCCAGTGTG
GGCAATAGCTTGGCAGCCGTACGGGGCAAGCTACCGCTGACGAGCCTCCTTGGACCGCAT
CCATTTTGAATTGCCAATATCCTCGACGGGTACTGGTGTCCATGTAATTGGATCAACAT
AACGACGCGAATCCATACCAACCAATGGGGATTCCACCACCAAGGTCTGAGGTCCGGAT
TTTCTGGTCCAACCCAGAAATGAGAAGGACTTGGAACTTGGGAACTTTCTTTCTGGTT
TCAACCAAAAACGTTATTGGGAATAATTGGCGGTTACCTCTCAAGGGAACCGCCATATTT
CCGGGGAAAAAGGCCATGGCCCAAAAAATTCGGTCCCAATATTCGCGCCTCGGTGC
CCGGAAGTTCATTTATCAAAGCTTAATTCAGATATCCGCTCCAACCTTCGAAGGGGGGGG
CCCGCGAACCCCAAAATTCGACCCATAATATTTATTTTGGGGG
```

# Adaptation de la technique à la fluorescence

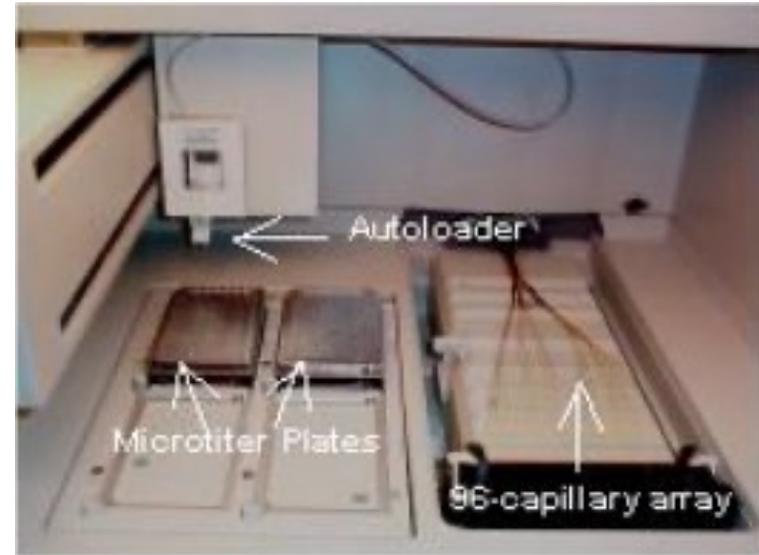
chaque ddNTP (ddATP,ddTTP,ddCTP,ddGTP) est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488nm et 514,5nm.Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP.

# Capillaires



[http://www.genomenewsnetwork.org/resources/whats\\_a\\_genome/Chp2\\_2.shtml](http://www.genomenewsnetwork.org/resources/whats_a_genome/Chp2_2.shtml)



<http://www.aecom.yu.edu/cancer/new/cores/sequencing/abi3700.htm>